

University of Groningen

## Excretion of proteins during fungal growth and development

Wösten, Herman Abel Bernard

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1994

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Wösten, H. A. B. (1994). Excretion of proteins during fungal growth and development. Groningen: s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## SAMENVATTING

---

Myceliale schimmels koloniseren vochtige substraten, zoals hout, door aan de toppen van de hyfen (draden) te groeien en achter de top te vertakken, wat resulteert in een netwerk van hyfen; het mycelium. Op een bepaald moment in de levenscyclus zal de schimmel hyfen vormen die het hydrofiele (waterminnende) substraat verlaten en in een hydrofobe (waterafstotende) omgeving gaan groeien. Zo vormen veel schimmels luchtstructuren zoals luchthyfen en paddestoelen om de voortplanting mogelijk te maken, terwijl pathogene (ziekteverwekkende) schimmels vaak aan het hydrofobe oppervlak van een plant of een dier moeten hechten voordat zij de gastheer binnen kunnen dringen. Schimmels scheiden enzymen uit die het substraat (bijvoorbeeld hout) afbreken tot kleine moleculen die kunnen worden opgenomen om als voedsel te dienen, terwijl andere eiwitten functies aan het oppervlak van de hyfen vervullen bij de interactie van deze hyfen met hun omgeving en met elkaar (Wessels, 1993). Om deze functies te vervullen moeten de eiwitten de cel-omvattende wand passeren om het oppervlak van de hyfe te bereiken. Echter, in de celwand lijken geen poriën aanwezig te zijn groot genoeg om deze eiwitten te laten passeren. Waar en hoe eiwitten de celwand passeren was oorspronkelijk het doel van mijn onderzoek. Hiertoe bestudeerde ik de uitscheiding van het zetmeel-afbrekende enzym glucoamylase bij *Aspergillus niger* en de uitscheiding van lignine peroxidases, die betrokken zijn bij de afbraak van lignine in hout, bij *Phanerochaete chrysosporium*. Gedurende het onderzoek verplaatste de aandacht zich naar de uitscheiding van het hydrophobin eiwit Sc3p en de rol die dit eiwit speelt bij de vorming van luchthyfen in *Schizophyllum commune*.

### Uitscheiding van substraat afbrekende eiwitten.

Tijdens de primaire groeifase van de schimmel *A. niger* bleek de uitscheiding van glucoamylase plaats te vinden aan de toppen van groeiende hyfen die het mycelium doen uitbreiden (het buitenste gedeelte van de kolonie) en aan de toppen van de groeiende hyfen in de vertakkingszone direct daarachter. In het centrum van het mycelium waar geen groei werd waargenomen werd het eiwit eveneens gevormd maar hier werd het eiwit niet uitgescheiden in het medium maar bleef geassocieerd met de hyfen. Wanneer de groei in het gehele mycelium werd gestopt door een temperatuurschok, bleek ook aan de rand van de kolonie geen eiwit meer uitgescheiden te worden (Hoofdstuk 2).

Lignine peroxidases (Lip and Mnp) worden tijdens de ideofase van een culture van *Ph. chrysosporium* uitgescheiden, een fase waarin de biomassa van de schimmel niet meer toeneemt. Bestudering van de uitscheiding van deze eiwitten leek interessant omdat in dit geval de koppeling tussen groei en eiwituitscheiding niet leek te bestaan. Echter, deze eiwitten bleken eveneens uitgescheiden te worden door groeiende hyfen in een zone van secundaire groei, die zich vanuit het centrum van het mycelium naar de buitenzijde uitspreidde. Deze hyfen werden kennelijk ten koste van de primaire hyfen gevormd (Hoofdstuk 3).

De waarneming dat uitscheiding van glucoamylase, lignin peroxidases en het hydrophobin eiwit Sc3p (zie later) slechts plaatsvindt aan de toppen van groeiende hyfen ondersteunt de zogenaamde "bulk flow" hypothese (Wessels, 1989, 1990). Deze hypothese beschrijft een grotendeels porie-onafhankelijke passage van eiwitten door de celwand aan de groeiende top van een hyfe door co-migratie met de stroom van de verschillende celwandpolymeren die naar de buitenzijde van de celwand worden gedrukt door enerzijds de interne druk in de hyfe en anderzijds de toevoeging van nieuwe celwandpolymeren aan de binnenzijde van de wand. In niet groeiende hyfen is de celwand dicht vernet door interacties die tussen de verschillende celwandpolymeren zijn opgetreden. Hier kunnen eiwitten de celwand niet passeren door afwezigheid van poriën en de afwezigheid van de stroom nog onverniet celwandpolymeren. Deze hypothese zou de efficiënte uitscheiding van eiwitten in filamenteuze schimmels kunnen verklaren.

#### **Uitscheiding van het hydrophobin Sc3p en de rol bij de vorming van luchthyfen in *Schizophyllum commune*.**

Hydrophobins zijn kleine hydrofobe (waterafstotende) cysteine-rijke eiwitten, die oorspronkelijk ontdekt werden als de producten van genen die hoog tot expressie komen tijdens de ontwikkeling van luchthyfen en paddestoelen in *S. commune* (Schuren en Wessels, 1990; Wessels et al., 1991ab). Sindsdien zijn hydrophobin genen in verschillende andere schimmels geïdentificeerd en in verband gebracht met de vorming van verschillende structuren (Wessels, 1993). Waarschijnlijk worden deze eiwitten door alle schimmels in grote hoeveelheden gevormd en uitgescheiden, maar werden ze niet eerder opgemerkt door hun speciale eigenschappen. Het hydrophobin Sc3p uit *S. commune* is tot dusverre het enige hydrophobin dat gezuiverd en gedeeltelijk gekarakteriseerd is. Sc3p blijkt betrokken bij de vorming van luchthyfen en kan tot 10%

van het totaal gevormde als monomeer (bouwsteen) bleek in celwanden van (bijvoorbeeld onoplosbaar) slechts middels trifluoro- (Hoofdstuk 4). Monomeer (hydrofiel/hydrofoob) de amfipatische eiwitmembranen hydrofiel en aan de andere die naar het water is (Hoofdstuk 7 en 8), ter gekarakteriseerd wordt (rodlets) (Hoofdstuk 5). verschil in distributie van Soortgelijke rodlets als v luchthyfen waargenomen enkele membraan van S (5 en 6).

Uit deze waarnemingen tijd werd een model voer eerst een bepaalde hoeveel wordt het Sc3 gen actie toppen van groeiende h uitgescheiden. In de ver grensvlak van het waterig hyfen wordt uitgescheiden de lucht (hydrofoob) sp assembleren. Deze mer (hydrofobe) lucht en w parallelle rodlets. De bi doordat beide hydrofiel z buitenzijde waterafstoten terugkeer in het waterig groeien doordat zij voor

s de ideofase van een culture  
e biomassa van de schimmel  
deze eiwitten leek interessant  
cheiding niet leek te bestaan.  
vorden door groeiende hyfen  
trum van het mycelium naar  
n koste van de primaire hyfen

se, lignin peroxidases en het  
e toppen van groeiende hyfen  
vessels, 1989, 1990). Deze  
passage van eiwitten door de  
gratie met de stroom van de  
n de celwand worden gedrukt  
s de toevoeging van nieuwe  
niet groeiende hyfen is de  
ende celwandpolymeren zijn  
door afwezigheid van poriën  
polymeren. Deze hypothese  
schimmels kunnen verklaren.

#### vorming van luchthyfen in

cysteïne-rijke eiwitten, die  
die hoog tot expressie komen  
n *S. commune* (Schuren en  
ijn hydrophobin genen in  
nd gebracht met de vorming  
k worden deze eiwitten door  
eiden, maar werden ze niet  
t hydrophobin Sc3p uit *S.*  
gezuiverd en gedeeltelijk  
n luchthyfen en kan tot 10%

van het totaal gevormde eiwit van de schimmel uitmaken (Hoofdstuk 4). Dit eiwit werd als monomeer (bouwsteen) in het medium van stilstaande cultures aangetoond, maar bleek in celwanden van luchthyfen in een zeer-onoplosbaar complex voor te komen (bijvoorbeeld onoplosbaar in hete SDS) (Wessels et al., 1991ab). Dit complex kon slechts middels trifluoroazijnzuur of mierzuur worden gedissocieerd tot monomeren (Hoofdstuk 4). Monomeer gezuiverd Sc3p bleek op het grensvlak tussen water en lucht (hydrofiel/hydrofoob) door zelf-assemblage over te gaan in een SDS-onoplosbare amfipatische eiwitmembraan, dat wil zeggen een membraan die aan de ene kant hydrofiel en aan de andere kant hydrofoob is (Hoofdstuk 5). De zijde van de membraan die naar het water is gericht is hydrofiel en bevat geen duidelijke ultrastructuur (Hoofdstuk 7 en 8), terwijl de zijde die naar de lucht is gericht hydrofoob is en gekarakteriseerd wordt door de aanwezigheid van een mozaïek van parallelle staafjes (rodlets) (Hoofdstuk 5). Het amfipatisch karakter van de membraan uit zich ook in een verschil in distributie van atomen aan beide zijden van de membraan (Hoofdstuk 9). Soortgelijke rodlets als verkregen met het gezuiverde eiwit werden op het oppervlak van luchthyfen waargenomen en middels een poly-klonaal antiserum tegen Sc3p werd een enkele membraan van Sc3p aan het oppervlak van luchthyfen aangetoond (Hoofdstuk 5 en 6).

Uit deze waarnemingen en de resultaten omtrent het verschijnen van Sc3p in de tijd werd een model voor de vorming van luchthyfen opgesteld (Hoofdstuk 6). Nadat eerst een bepaalde hoeveelheid assimilerend mycelium in het substraat gevormd is, wordt het Sc3 gen actief. Dit leidt tot de vorming van monomeer Sc3p dat aan de toppen van groeiende hyfen aan de rand van het mycelium in het substraat wordt uitgescheiden. In de vertakkingszone direct achter deze hyfen breken hyfen door het grensvlak van het waterige substraat en de lucht. Sc3p dat aan de toppen van dergelijke hyfen wordt uitgescheiden blijkt hier aan het grensvlak van de celwand (hydrofiel) en de lucht (hydrofoob) spontaan in een amfipatische SDS-onoplosbare membraan te assembleren. Deze membraan is hydrofoob aan de zijde die gericht is naar de (hydrofobe) lucht en wordt morfologisch gekarakteriseerd door een mozaïek van parallelle rodlets. De binnenzijde van de membraan is compatibel met de celwand doordat beide hydrofiel zijn. Door de assemblage van Sc3p wordt een luchthyfe aan de buitenzijde waterafstotend en dit zou verdere groei in de lucht kunnen bepalen doordat terugkeer in het waterige substraat niet meer mogelijk is. Deze hyfen kunnen alleen groeien doordat zij voorzien worden van voedsel vanuit het assimilerend mycelium.

Sc3p blijkt niet alleen op het grensvlak tussen water en lucht te assembleren, maar aan een hydrofiel/hydrofoob grensvlak in het algemeen, zoals tussen water en olie of tussen water en teflon (Hoofdstuk 7 en 8). De assemblage van Sc3p aan het grensvlak wordt primair bepaald door de mate van hydrofobiciteit van het oppervlak van het materiaal en niet door fysische of chemische eigenschappen van dit oppervlak. Deze waarneming impliceert dat hydrophobins niet alleen betrokken zouden kunnen zijn bij het bedekken van luchtstructuren met een hydrofobe membraan maar tevens bij processen die betrokken zijn bij hechting van hyfen aan een hydrofoob oppervlak. Hyfen die Sc3p uitscheidten en die over teflon groeiden bleken inderdaad sterk aan het teflon te hechten en geassembleerd Sc3p werd immunologisch op het grensvlak van celwand en teflon aangetoond. Sterke hechting van pathogene schimmels aan de gastheer is noodzakelijk voor het binnendringen van hyfen in de gastheer. Aangezien planten en dieren vaak een hydrofoob oppervlak bezitten, zou deze hechting veroorzaakt kunnen worden door assemblage van hydrophobins tussen de celwand van de schimmel en het oppervlak van de gastheer. Genetische experimenten met pathogene schimmels die in andere laboratoria zijn uitgevoerd ondersteunen deze hypothese.

Andere hydrophobins zouden betrokken kunnen zijn bij de vorming van weefsels waarbij hyfen aggregeren, zoals bij de vorming van vruchtlichamen. Tenslotte zouden hydrophobins gebruikt kunnen worden voor verschillende technische toepassingen.

## REFERENCES

- Adamson, A.W. (1990). Sons Inc, 25-28.
- Andrawis, A., Pease, Characterization of two Biochemical and Biophys
- Ásgeirsdóttir, S.A. (19 commune. PhD Thesis, U
- Asther, M., Lesage, L. and fatty acid enrichment production. Applied Micro
- Asther, M. Bellon-Fo thermodynamic model to solid carriers in relation 35, 477-482.
- Bartoszewicz, K. (1986) 2-29.
- Basrai, M.A., Naider, *Candida albicans* by flu 1065.
- Beever, R.E. (1979). *Neurospora crassa* conid
- Beever, R.E., and Den spores. *Nature* 272, 608-
- Bell-Pedersen, D., Dunl controlled gene, *ccg-2*, formation of the conidial
- Bigger, C.H., White, secretion of the slime m 159-166.
- Blain, J.A. (1975). Ind J.E., and Berry, D.R.).
- Blanchette, R.A., Abac lignin peroxidase and basidiomycetes. *Applied*
- Bolyard, M.G., and St toxin in *Escherichia coli*.
- Bonnarme, P., and Je manganese-dependent p Environmental Microbiol
- Borrebaeck, C.A.K., M partial characterization o *Journal of Bacteriology* 1
- Bos, C.J., Debets, A.J (1988). Genetic analysis linkage groups in *Asperg*